

# MIKROBNE KULTURE U SIRARSTVU I NEKI POSTUPCI OČUVANJA NJIHOVE STABILNOSTI

---

**Kvesić, Ivana**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Karlovac University of Applied Sciences / Veleučilište u Karlovcu**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:128:812823>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-06**



**VELEUČILIŠTE U KARLOVCU**  
Karlovac University of Applied Sciences

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Karlovac University of Applied Sciences - Institutional Repository](#)



zir.nsk.hr



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

**VELEUČILIŠTE U KARLOVCU**  
**STRUČNI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA**  
**PRERADA MLIJEKA**

**IVANA KVESIĆ**

**MIKROBNE KULTURE U SIRARSTVU I NEKI POSTUPCI**  
**OČUVANJA NJIHOVE STABILNOSTI**

**ZAVRŠNI RAD**

**KARLOVAC, 2021.**

**Veleučilište u Karlovcu**  
Stručni studij prehrambena tehnologija  
Prerada mlijeka

Ivana Kvesić

**Mikrobne kulture u sirarstvu i neki postupci očuvanja njihove  
stabilnosti**

Završni rad

Mentor: doc. dr. sc. Marijana Blažić, prof. v. š.  
Neposredni voditelj: Elizabeta Zandona, mag.ing.bioproc., asistentica  
Broj indeksa studenta: 0314616053

Karlovac, rujan 2021.

*Zahvaljujem se doc. dr. sc. Marijani Blažić, prof. v. š. što mi je omogućila izradu ovog završnog rada te na cjelovitom prenesenom stručnom znanju tijekom studiranja. Zahvaljujem se asistentici Elizabeti Zandona, mag. ing. bioproc. na pruženoj potpori, mnogobrojnim savjetima, uloženom trudu i vremenu.*

*Najveću zahvalu za ono što sam postigla dugujem svojim roditeljima i sestri koji su uvijek bili moja najveća podrška i oslonac.*

## IZJAVA O AUTENTIČNOSTI ZAVRŠNOG RADA

Ja, **Ivana Kvesić**, ovime izjavljujem da je moj završni rad pod naslovom **Mikrobne kulture u sirarstvu i neki postupci očuvanja njihove stabilnosti** rezultat vlastitog rada i istraživanja te se oslanja na izvore i radove navedene u bilješkama i popisu literature. Ni jedan dio ovoga rada nije napisan na nedopušten način, odnosno nije prepisan iz necitiranih radova i ne krši autorska prava.

Sadržaj ovoga rada u potpunosti odgovara sadržaju obranjenoga i nakon obrane uređenoga rada.

Karlovac, 30. kolovoza 2021.

Ivana Kvesić

---

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Veleučilište u Karlovcu  
Odjel prehrambene tehnologije  
Stručni studij prehrambena tehnologija

Završni rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### MIKROBNE KULTURE U SIRARSTVU I NEKI POSTUPCI OČUVANJA NJIHOVE STABILNOSTI

*Ivana Kvesić*

Rad je izrađen na Odjelu prehrambene tehnologije Veleučilišta u Karlovcu u sklopu projekta „Modifikacija procesa zrenja sira i razvoj proizvoda na bazi sirutke - SIRENA“ (KK.01.1.1.04.0096).

**Mentor:** *doc. dr. sc. Marijana Blažić, prof. v. š.*

**Neposredni voditelj:** *Elizabeta Zandona, mag.ing.bioproc., asistentica*

#### Sažetak

Kvaliteta sira ovisi o kvaliteti mlijeka, primijenjenom procesu proizvodnje, korištenim procesnim uređajima, dodatcima, ali i o primijenjenim mikrobnim kulturama (starterima) koje gotovom proizvodu daju željeni okus, miris i konzistenciju. Danas se u proizvodnji sireva koriste različiti pripravci definiranih mikrobnih kultura u čijem se sastavu, ovisno o tipu sira, mogu naći bakterije mliječne kiseline, bakterije propionske kiseline, sojevi bakterije *Brevibacterium linens* i različite plemenite plijesni. Radi očuvanja stabilnosti i vijabilnosti mikrobnih kultura, razvijene su posebne tehnike pripreme specijalnih oblika mikrobnih (starter) kultura za sirarstvo koje se proizvode i isporučuju kao: tekući, matični, liofilizirani (suho smrznuti) ili koncentrirani smrznuti pripravci. U ovom radu prikazane su mikrobne kulture koje se najčešće primjenjuju u sirarstvu te su obuhvaćene tehnike proizvodnje mikrobnih pripravaka za sirarstvo s ciljem zaštite i održavanja stabilnosti mikrobnih kultura.

**Broj stranica:** 30

**Broj slika:** 6

**Broj tablica:** 8

**Broj literaturnih navoda:** 51

**Broj priloga:** -

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** inkapsulacija, liofilizacija, primarne kulture, sekundarne kulture, sir

**Datum obrane:** 13. rujna 2021.

#### Stručno povjerenstvo za obranu:

1. *dr. sc. Bojan Matijević, prof. v. š.*
2. *dr. sc. Jasna Halambek, v. pred.*
3. *dr. sc. Marijana Blažić, prof. v. š.*
4. *dr. sc. Ines Cindrić, prof. v. š. (zamjena)*

Rad je pohranjen u knjižnici Veleučilišta u Karlovcu, Trg J. J. Strossmayera 9, 47000 Karlovac, Hrvatska.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

---

**Karlovac University of Applied Sciences  
Department of Food Technology  
Professional Study of Food Technology**

**Final paper**

**Scientific Area: Biotechnical Sciences  
Scientific Field: Food Technology**

### **MICROBIAL CULTURES IN CHEESE PRODUCTION AND SOME METHODS FOR PRESERVING THEIR STABILITY**

*Ivana Kvesić*

**Final paper performed at the Department of Food technology of Karlovac University of Applied Sciences as part of the project "Modification of cheese ripening process and development of whey based products - SIRENA" (KK.01.1.1.04.0096).**

**Supervisor:** *Ph.D. Marijana Blažić, college prof.*

**Co-supervisor:** *Elizabetha Zandona, MSc in Bioprocess Engineering, Assistant*

#### **Abstract**

The quality of cheese primarily depends on the quality of the milk, the applied production process, the process devices used, additives, but also on the applied microbial cultures (starters) that give the desired taste, smell, and consistency to the finished product. Depending on the type of cheese, modern cheese manufacturing, includes various preparations of defined microbial cultures, usually composed of lactic acid bacteria, propionic acid bacteria, *Brevibacterium linens* strains, and various noble moulds. In order to preserve the stability and viability of microbial cultures, special techniques have been developed for the preparation of different forms of microbial (starter) cultures for cheese production (liquid, lyophilized or concentrated preparations). This paper covers the most commonly used microbial cultures in cheese-making and some techniques for the production of starter cultures for cheese production with the aim of protecting and maintaining the stability of those cultures.

**Number of pages: 30**

**Number of figures: 6**

**Number of tables: 8**

**Number of references: 51**

**Original in:** Croatian

**Key words:** cheese, encapsulation, lyophilization, primary cultures, secondary cultures

**Date of the final paper defense:** 13<sup>th</sup> September 2021

#### **Reviewers:**

1. *Ph.D. Bojan Matijević, collage prof.*
2. *Ph.D. Jasna Halambek, sen. lecturer*
3. *Ph.D. Marijana Blažić, collage prof.*
4. *Ph.D. Ines Cindrić, collage prof. (substitute)*

**Final paper deposited in: Library of Karlovac University of Applied Sciences, Trg J. J. Strossmayera 9, 47000 Karlovac, Croatia.**

## Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Sir - opće karakteristike i proizvodnja.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1.1. Vrste sireva .....</b>	<b>2</b>
2.1.1.1. <i>Syježi sirevi.....</i>	<i>4</i>
2.1.1.2. <i>Meki sirevi .....</i>	<i>4</i>
2.1.1.3. <i>Polutvrđi sirevi .....</i>	<i>4</i>
2.1.1.4. <i>Tvrđi sirevi.....</i>	<i>5</i>
2.1.1.5. <i>Ekstra tvrđi sirevi .....</i>	<i>5</i>
<b>2.1.2. Kemijski sastav sira .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1.3. Prehrambena vrijednost sira .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1.4. Proizvodnja sira .....</b>	<b>8</b>
<b>2.2. Mikrobne kulture u proizvodnji sira.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2.1. Osnovne (primarne) kulture .....</b>	<b>11</b>
<b>2.2.2. Dopunske (sekundarne) kulture .....</b>	<b>14</b>
2.2.2.1. <i>Kulture probiotičkih bakterija.....</i>	<i>15</i>
2.2.2.2. <i>Propionske mikrobne kulture.....</i>	<i>15</i>
2.2.2.3. <i>Kulture kvasaca .....</i>	<i>16</i>
2.2.2.4. <i>Kulture plemenitih plijesni .....</i>	<i>17</i>
2.2.2.5. <i>Kulture površinskog maza sira .....</i>	<i>18</i>
2.2.2.6. <i>Zaštitne mikrobne kulture.....</i>	<i>19</i>
<b>2.2.3. Čuvanje i održavanje mikrobnih kultura.....</b>	<b>19</b>
<b>2.3. Neki postupci zaštite i održavanja stabilnosti mikrobnih kultura .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3.1. Sušenje raspršivanjem (eng. <i>Spray Drying</i>).....</b>	<b>20</b>
<b>2.3.2. Liofilizacija (engl. <i>Freeze Drying</i>).....</b>	<b>21</b>
<b>2.3.3. Inkapsulacija .....</b>	<b>22</b>
2.3.3.1. <i>Mikroinkapsulacija mikrobnih kultura.....</i>	<i>24</i>
<b>3. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>26</b>
<b>4. LITERATURA.....</b>	<b>27</b>



## 1. UVOD

Proizvodnja sira predstavlja jedan od najstarijih načina iskorištavanja mlijeka, odnosno najstariji način konzerviranja vrijednih i lako pokvarljivih bjelančevina mlijeka za ljudsku prehranu. Tako različitim tehnološkim postupcima iz okusno neutralne bjelančevine mlijeka, kroz različite fizikalne, kemijske i biokemijske procese i pretvorbe tijekom zrenja, nastaje ukusan te prehrambeno i gastronomski vrijedan proizvod – sir. Proizvodnja sira u svijetu naglo je porasla potkraj 19. stoljeća, a od tada je tradicionalna proizvodnja na malim obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima napredovala u suvremeno sirarstvo koje danas čini sastavni dio nacionalnih i multinacionalnih prehrambenih industrija i tržište opskrbljuje vrlo vrijednim sirevima.

U proizvodnji sira mlijeko se zgušnjava primjenom različitih vrsta sirila uslijed čega se koncentriraju prvenstveno proteini mlijeka (kazein) te izdvaja sirutka. Mikroorganizmi i njihovi enzimi imaju ključnu ulogu u proizvodnji sira i daljnjim biokemijskim procesima koji tijekom zrenja siru daju oblik i karakterističan miris. Specifičan okus, miris i konzistencija sira razlikuju se ovisno o upotrijebljenom mlijeku, trajanju i uvjetima zrenja, aditivima, no ponajviše o primijenjenim primarnim i sekundarnim mikrobnim kulturama. Takve kulture su dominantnije i "brže" od autohtone mikroflore, njihovo djelovanje se može predvidjeti i kontrolirati te se proizvodni proces njihovom primjenom ubrzava. Danas se u proizvodnji sira koriste pripravci (tekući, osušeni, smrznuti) mikrobnih kultura (mono- i/ili mješovite kulture) različitih vrsta bakterija, kvasaca, plijesni i njihovih međusobnih kombinacija o vrsti sira koji se proizvodi (Matijević, 2015). S tehnološkog aspekta proizvodnje mikrobnih kultura za sirarstvo da bi ostvarili željeni cilj, neophodno je osigurati odgovarajuću količinu živih stanica mikroorganizama te održati njihovu vijabilnost, odnosno stabilizirati ih tijekom postupka proizvodnje. Dodatak različitih zaštitnih tvari, uklapanje stanica u mikrokapsule tijekom zamrzavanja, sušenja ili čuvanja, može se bitno povećati broj živih stanica po gramu pripravka (Anal i Singh, 2007; Champagne i Fustier, 2007). Uspostavljanje fizičke barijere između živih stanica mikroorganizama i nepovoljnih vanjskih uvjeta novi je koncept od sve veće važnosti. Iz tog razloga, provedena su brojna istraživanja u pogledu očuvanja vijabilnosti starter kultura u različitim procesima proizvodnje hrane te su razvijeni postupci pripreme pogodnih pripravaka mikrobnih kultura za pojedine proizvode pa tako i sir. Svrha ovog istraživanja bila je istražiti mikrobne (starter) kulture koje se najčešće koriste u sirarstvu s naglaskom na ulogu liofilizacije i inkapsulacije u proizvodnji navedenih kultura. Najznačajniji mikroorganizmi, pripravci primarnih i sekundarnih starter kultura za sirarstvo i njihov značaj za tehnologiju proizvodnje sira prikazani su u ovom završnom radu.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Sir - opće karakteristike i proizvodnja

Prema Pravilniku o sirevima i proizvodima od sireva (Narodne novine, 2009), sirevi su svježi proizvodi ili proizvodi s različitim stupnjem zrelosti koji se proizvode odvajanjem sirutke nakon zgrušavanja mlijeka (kravljega, ovčjega, kozjega, bivoljeg mlijeka i/ili njihovih mješavina), vrhnja ili kombinacijom navedenih sirovina. U proizvodnji sira dopuštena je upotreba mljekarskih kultura, sirila i/ili drugih odgovarajućih enzima zgrušavanja i/ili dopuštenih kiselina za zgrušavanje

Sir se definira i kao fermentiran ili nefermentiran proizvod dobiven nakon zgrušavanja mlijeka obranog ili djelomično obranog mlijeka, vrhnja, mlaćenice ili kombinacijom navedenih sirovina te otjecanjem sirutke (uz dodatak sirila ili nekog drugog zamjenskoga enzima zgrušavanja) (Havarnek i sur., 2014). Prema tome, sir je koncentrirani i konzervirani oblik u vodi netopljivih ili djelomično topljivih sastojaka mlijeka, uz zadržavanje manjega ili većeg dijela vode koji određuju vrstu i organoleptička svojstva sira (Kirin, 2016).

#### 2.1.1. Vrste sireva

Kao kriterij podjele sireva prema konzistenciji uzima se udjel vode u bezmasnoj tvari sira. Time se izbjegava ovisnost konzistencije sirnog tijesta o stvarnom udjelu mliječne masti u siru. Sirevi se prema udjelu vode u bezmasnoj tvari sira, te konzistenciji i građi, proizvode i stavljaju na tržište pod nazivom: ekstra tvrdi, tvrdi, polutvrđi, meki i svježi sir (Tablica 1) (Narodne novine, 2009).

**Tablica 1.** Vrste sireva prema udjelu vode u bezmasnoj suhoj tvari sira (Kirin, 2016).

Naziv sira	Udjel vode u bezmasnoj tvari sira (%)
Ekstra tvrdi sir	< 51
Tvrdi sir	49 – 56
Polutvrđi sir	54 – 69
Meki sir	> 67
Svježi sir	69 – 85

Prema udjelu mliječne masti, sirevi mogu biti posni do ekstra masni s više od 55% masti u suhoj tvari sira (Tablica 2), dok se prema načinu zrenja dijele na one koji ne zriju, na one koji zriju pretežno s bakterijama u unutrašnjosti, na one koji zriju pretežno s bakterijama na površini i na one koji zriju s plijesnima pretežno u unutrašnjosti i s plijesnima pretežno na površini (Tablica 3) (Božanić, 2015).

**Tablica 2.** Vrste sireva obzirom na udio mliječne masti u suhoj tvari sira (Kirin, 2016).

Naziv sira	Udio mliječne masti u suhoj tvari sira (%)
Ekstramasni	$\geq 60$
Punomasni	$\geq 45$ i $< 60$
Masni	$\geq 25$ i $< 45$
Polumasni	$\geq 10$ i $< 25$
Posni	$< 10$

**Tablica 3.** Vrste sireva obzirom na zrenje sira (Tratnik, 1998).

Zrenje	Tip sira	Primjer
Sirevi bez zrenja (svježi)	Pastozni tip	Svježi sir, kremasti sirevi
	Zrnati tip	Zrnati i kremasti zrnati Svježi sir
	Plastični, rastezljivi tip	Mozzarella
Sirevi sa zrenjem (uz bakterije)	Na površini	Limburger, Romadur
	U unutrašnjosti: bez tvorbe plina uz tvorbu plina	Parmezan, Paški sir Ementaler, Gauda
	U salamuri	Feta, Travnički, bijeli sir u kriškama
Sirevi sa zrenjem (uz plemenite plijesni)	Na površini – bijele	Camambert, brie
	U unutrašnjosti – plave/zelene	Roquefort, Gorgonzola
	Površina/unutrašnjost	plavi brie, Cambozola

#### *2.1.1.1. Svježi sirevi*

Svježi sirevi najstarija su vrsta sireva koji potječu iz prvih vremena prerade mlijeka u sir. Sadržavaju 69-85 % vode u bezmasnoj tvari. Oni su kiselinski sirevi, jer se dobivaju djelovanjem mliječne kiseline, koju fermentacijom tvore bakterije mliječne kiseline (BMK). Ovi sirevi nemaju postupak zrenja, već se upotrebljavaju svježi. Odatle im potječe i ime. Zbog visokog sadržaja vode, njihov je rok upotrebe kratak. Najčešće se razvrstavaju prema konzistenciji i prema sadržaju masti u suhoj tvari. Konzistencija sira može biti pastozna, zrnata i lisnata, a ovisi o udjelu suhe tvari sira, odnosno o udjelu vode u bezmasnoj tvari. Prema udjelu masti u suhoj tvari, dijele se na: ekstra masni, punomasni, masni, polumasni i posni. Porastom udjela masti raste i udjel suhe tvari sira, a snižava se udjel bjelančevina i laktoze (Kirin, 2016).

#### *2.1.1.2. Meki sirevi*

U skupinu mekih sireva pripadaju sirevi koji sadržavaju više od 67% vode u bezmasnoj tvari sira. Visok sadržaj vode postiže se samoprešanjem mekih sireva, tj. prešanjem vlastitom masom bez upotrebe tlaka. Proizvode se uglavnom od termički obrađenog kravljeg mlijeka. Malih su dimenzija, različitih sadržaja mliječne masti, s razmjerno kratkim vremenom upotrebe, kod kojih se zrenje odvija od površine prema središtu sira, po čemu se i prepoznaje stupanj zrelosti sira (Slika 1). Na taj se način oblikuju i karakteristična organoleptička svojstva sireva: tanka i nježna kora, meka konzistencija tijesta, koja starenjem postaje žitka, bez oblikovanih okašaca, te izražen kiselkasti miris i okus sira (Kirin, 2016).

#### *2.1.1.3. Polutvrđi sirevi*

Polutvrđi sirevi sadržavaju 54-69% vode u bezmasnoj tvari sira. Proizvode se kao punomasni ( $\geq 45$  i  $< 60\%$ ) i kao masni sirevi ( $\geq 25$  i  $< 45\%$ ). Njihova organoleptička svojstva (konzistencija tijesta, karakteristike okašaca, okus i miris) uvjetovani su prvenstveno aktivnošću upotrijebljene mezofilne mljekarske kulture i tehnološkim postupkom, koji karakteriziraju niže temperature sirenja (oko 30 °C) i niže temperature „sušenja“ sirnog zrna ( $< 36-39$  °C), te dodavanje tople vode i „pranje“ sirnog zrna. Tehnologija polutvrđih sireva uključuje pretprešanje i prešanje sira, te soljenje sira nakon prešanja u salamuri. Prosječno zriju oko 5 tjedana. Tijekom zrenja i čuvanja kora sireva najčešće je zaštićena voskom, parafinom, plastičnim premazom. Zrenje se odvija istovremeno u cjelokupnoj masi sira. U novije vrijeme mnoge vrste polutvrđih sireva zriju umotani u plastičnu foliju ili vakuumirani u polimernu vrećicu („hladno zrenje“, sir bez kore). Polutvrđi sirevi su najraširenija su skupina sireva, a tradicionalno su vezani uz nizozemsko sirarstvo. Najpoznatije vrste su: Gouda, Edamac, Tilzit i drugi (Slika 1) (Kirin, 2016).

#### 2.1.1.4. Tvrđi sirevi

Skupini tvrdih sireva pripadaju sirevi koji sadržavaju 49-56% vode u bezmasnoj tvari sira. Zbog veće količine vode, konzistencija sirnog tijesta je elastična i reziva. Za razliku od ekstratvrdih sireva, koji se konzumiraju ribani ili nalomljeni, tvrdi sirevi pogodni su za rezanje (Slika 1). Dužim skladištenjem i stajanjem pojedine vrste tvrdih sireva mogu poprimiti svojstva sireva za ribanje. Njihovu tehnologiju karakteriziraju relativno visoke temperature sušenja sirnog zrna, duže zrenje (3-4 tjedna) i veliki oblici i mase sira. Razlikuju se uglavnom prema upotrijebljenom mlijeku (sirovo, pasterizirano ili termizirano), vrsti dodane mikrobnog kulture (mezofilna, termofilna ili miješana), te prema organoleptičkim svojstvima, od kojih se posebno ističu sirne oči i slatkasti okus (Kirin, 2016).

#### 2.1.1.5. Ekstra tvrdi sirevi

Ovoj skupini sireva pripadaju sirevi za ribanje, koji sadržavaju manje od 51% vode u bezmasnoj tvari sira. To su sirevi većinom velikih oblika i velike mase, koja se kreće između 13 i 40 kg. S obzirom na tehnologiju proizvodnje i postupak dugog zrenja (godinu dana i više), dobivaju se sirevi tvrde, glatke, svijetle, čiste, ponekad i uljane kore. Tijesto sireva je zrnate konzistencije, tvrdo, zbito i lomljivo. Ujednačeno zrije kroz cijelu masu sira, bez tvorbe sirnih okašaca. Najpoznatiji ekstra tvrdi sir u Hrvatskoj je sir Ribanac (Kirin, 2016).



**Slika 1.** Različite vrste sireva (Anonymus, 2021)

### 2.1.2. Kemijski sastav sira

Osim vode, temeljni kemijski sastav sireva čine: bjelančevine, masti, ugljikohidrati, mineralne tvari, vitamini i drugi sastojci u tragovima kako je prikazano u Tablici 4. Udjel ovih sastojaka određen je skupinom i vrstom sira.

Sir predstavlja prirodnu namirnicu bogatu sadržajem bjelančevina, radi čega njegovo redovito konzumiranje doprinosi potpunoj opskrbi organizma dnevno potrebnim bjelančevinama. Osnovna bjelančevina sira je kazein, koji se tijekom zrenja razgrađuje preko peptida do visokovrijednih aminokiselina. Udjel bjelančevina ovisi o vrsti sira, a izražava se količinom u 100 g. Što je sir zreliji, to je udjel bjelančevina viši (Kirin, 2016).

**Tablica 4.** Prosječan kemijski sastav polutvrdih sireva (Kirin, 2016).

Sastojak	Udjel (%)
Voda	41 – 48
Suha tvar	52 – 60
Mast	15 – 28
Mast u suhoj tvari sira	30 – 47
Voda u bezmasnoj tvari sira	56 – 58
Sol	1,4 – 2,4

Osim kemijskog sastava, na pravilan tijek biokemijskih promjena tijekom zrenja sira utječu i mikroklimatski uvjeti u prostoriji za zrenje sira. Za pravilan tijek zrenja polutvrdih i tvrdih sireva u zrionici (Tablica 5) treba biti povoljna mikroklima koja podrazumijeva optimalnu temperaturu, relativnu vlažnost zraka i odgovarajući protok odnosno sastav zraka u zrionici (ventilacija) (Kalit, 2015).

**Tablica 5.** Mikroklimatski uvjeti u zrionici za pravilno zrenje polutvrdih i tvrdih sireva (Kalit, 2002).

Parametar	Temperatura (°C)	Relativna vlažnost (%)
Minimalno	10	60
Optimalno	12-15	70-80
Maksimalno	18	85

### 2.1.3. Prehrambena vrijednost sira

Važnost sira u prehrani proizlazi i iz njegova sadržaja 8 esencijalnih aminokiselina (izoleucin, leucin, lizin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofan, valin) koje organizam ne može sam proizvesti (Kirin, 2016). One su važne za izgradnju i obnovu stanica tkiva, organa, tjelesnih tekućina, te za funkcije središnjega živčanog sustava.

Mliječna mast je važan izvor energije potrebne ljudskom organizmu. Ona je i nositelj vitamina topljivih u masti (A, D, E, K), kao i aromatskih tvari, koje dodatno oplemenjuju svaku hranu. Udjel masti u siru izražava se u postotnom iznosu u odnosu na njegovu suhu tvar. Osim svježega i topljenog, ostali sirevi ne sadržavaju ugljikohidrate ili ih sadržavaju u vrlo malim količinama. Stoga energetska vrijednost sira proizlazi uglavnom iz mliječne masti i bjelančevina. Isto tako, sir je namirnica bogata vitaminima koji sudjeluju u mnogim metaboličkim procesima i u tvorbi mnogobrojnih specifičnih spojeva potrebnih za fiziološko funkcioniranje organizma. Najvažniji su među njima vitamini A, B<sub>2</sub> i B<sub>12</sub>. Vitamin B, magnezij i fosfor organizam koristi za oslobađanje energije iz hrane, dok su vitamini A i D važni za održavanje zdravlja kose, kože, kostiju i zuba (Kirin, 2016). Osim toga, sir je i prava riznica minerala, posebice kalcija, fosfora i magnezija (Tablica 6).

**Tablica 6.** Prosječna količina mineralnih tvari u nekim sirevima izražena u mg na 100 g sira (Tratnik i Božanić, 2012).

<b>Vrsta sira</b>	<b>Kalcij</b> (mg)	<b>Fosfor</b> (mg)	<b>Natrij</b> (mg)	<b>Kalij</b> (mg)	<b>Magnezij</b> (mg)
Parmesan	1300	850	1200	100	44
Emmentaler	1080	730	250	90	43
Edam/Gouda	800	600	800	100	40
Tilsit	800	500	750	100	40
Plavi sir	420	350	1200	110	50
Mozzarella	400	340	450	100	16
Brie/Camembert	350	300	930	150	20
Svježi posni sir	90	190	30	120	9

Između svih namirnica sir se smatra najbogatijim izvorom kalcija (Walther i sur., 2008) koji igra vrlo važnu ulogu u izgradnji i stabilnosti kostiju, zubi, u funkcijama živčanog sustava, rada mišića i u zgrušavanju krvi (Xu i sur., 2020).

Također, količina kalcija značajno ovisi o načinu proizvodnje sira. Sirevi proizvedeni dodatkom sirila imaju puno veću količinu kalcija u odnosu na svježi sir (Božanić, 2015). Pored spomenutih makroelemenata, u siru se nalaze i minerali u tragovima (željezo, bakar, cink), odgovorni za mnoge tjelesne funkcije.

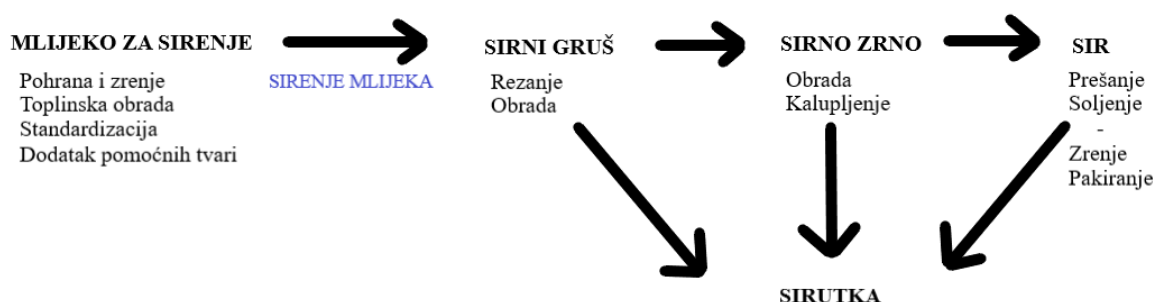
#### 2.1.4. Proizvodnja sira

Pod tehnologijom proizvodnje sireva podrazumijeva se skup teoretskih i iskustvenih znanja, metoda, vještina i tehnika korištenih u preradi sirovog mlijeka u sir, pri čemu se oblikuju njegova karakteristična prehrambena svojstva i kvaliteta koja ga čine posebnim i različitim od ostalih sireva. Sama proizvodnja sira uključuje vrlo složene fizikalno-kemijske i biokemijske promjene.

Prema Havranek i sur. (2014) tehnologija proizvodnje sira ima dva cilja:

1. Proizvesti sir željenih senzorskih osobina (vanjski izgled, boja, presjek, konzistencija, miris i okus);
2. Postaviti tehnološki lako ponovljivi protokol koji će za cilj svakodnevno dati sir istih osobina.

Osnovnu proizvodnju sira čine tehnološki postupci izdvajanja sirutke i standardizacije udjela vode u bezmasnoj suhoj tvari sira. Tim postupcima koncentriraju se sastojci mlijeka, prvenstveno bjelančevina – kazein, koja od neutralnog okusa biokemijskim procesima tijekom zrenja sira u konačnici daje oblik i karakterističan miris određenoj vrsti sira. Na taj način vrijedni, ali lako pokvarljivi i voluminozni, sastojci mlijeka i fizički prelaze u manje ili više čvrst oblik prikladan za čuvanje, transport i uporabu. Postupci izdvajanja sirutke u proizvodnji sirišnih sireva čine tri glavne tehnološke cjeline: obrada mlijeka za sirenje, obrada gruš i sirnog zrna i obrada sira (Slika 2).



**Slika 2.** Shematski prikaz osnovnih tehnoloških postupaka proizvodnje sira (Kirin, 2016)

U objektu za preradu mlijeka svakodnevno dolazi mlijeko određene sastava (mliječna mast, protein, suha tvar) i određenih svojstava (prisutnost poželjnih ili nepoželjnih mikroorganizama, somatskih stanica, antibiotika) na koje sirar u određenoj mjeri može utjecati.



Sirar može kontrolirati temperaturu sirenja i odabrati vrstu sirila potrebnu za zgrušavanje mlijeka. Također, kontrolira tijek zgrušavanja i može mijenjati pH vrijednost sve do postizanja određene kiselosti, ovisno o količini dodane mljekarske kulture.

Osim toga, standardizira odnos mliječne masti i proteina, ali i povećava koncentraciju topljivog kalcija u mlijeku dodavanjem  $\text{CaCl}_2$  (Havarnek i sur., 2014).

Iako količina i kvaliteta sira uvelike ovise o vrsti mlijeka, postupak proizvodnje također ima značajnu ulogu. Moderno mljekarstvo postepeno preuzima i prilagođava domaće tehnologije i proizvode, a primjena definiranih mikrobnih (starter) kultura omogućila je bolju kontrolu procesa i svakodnevnu proizvodnju sira istih osobina. U posljednje vrijeme izolacija autohtonih mikroorganizama prisutnih u tradicionalnim sirevima i njihova primjena u masovnoj proizvodnji sve je više u fokusu velikih proizvođača.

## **2.2. Mikrobnе kulture u proizvodnji sira**

Mikrobne kulture u sirarstvu predstavljaju definirani, selekcionirani i reproduktivno sposobni mikroorganizmi (bakterije, kvasci i plijesni) u čistoj ili mješovitoj kulturi, koji se koriste u proizvodnji sireva s ciljem optimalizacije tehnološkog procesa i poboljšanja organoleptičkih svojstava (Kirin, 2016). Mogu se definirati i kao pažljivo selekcionirani mikroorganizmi koji se dodaju u mlijeko ili gruш zbog iniciranja i izvođenja poželjne fermentacije i zrenja u proizvodnji različitih tipova sira, ali i fermentiranih mlijeka (Matijević, 2015). U sirarstvu, mikrobne kulture nazivaju se još sirarske ili mljekarske kulture, starter kulture, mikrobna cjepiva, čiste kulture i sl. Danas se uglavnom koriste u industrijskoj proizvodnji sireva, dok se u tradicionalnoj proizvodnji i u sadašnjoj proizvodnji sireva od sirovog mlijeka ne koriste.

Mikrobne kulture u proizvodnji sira imaju višestruku ulogu, koja ovisno o sastavu mikroorganizama (monokultura ili mješovita kultura) može biti: proizvodnja mliječne kiseline, hlapljivih aromatskih komponenti (diacetila i acetoina), plina ( $\text{CO}_2$ ), proteoliza, lipoliza te inhibicija patogenih mikroorganizama i mikroorganizama kvarenja (Matijević, 2015).

Glavni učinci mikrobne kulture mogu se svrstati u tri skupine:

1. produžena stabilnost i sigurnost sireva;
2. nastajanje željenih senzornih i reoloških svojstava sira;
3. nastajanje terapijskih/funkcionalnih svojstava sira.

Poznavanje mikrobnog sastava i svojstava mikrobne kulture olakšava pravilan odabir kako bismo dobili željeni sir i osigurali provedbu kontrolirane fermentacije i pravilne biokemijske procese tijekom zrenja.

Međutim, aktivnost mikroorganizama upotrijebljene mikrobne kulture (optimalno djelovanje njihovih endogenih ili egzogenih enzima) ovisi o procesnim uvjetima te provedbi pojedinih postupaka tijekom proizvodnje ili tijekom zrenja sira (Matijević, 2015).

U proizvodnji svih vrsta sira uvijek se primjenjuju mikrobne kulture bakterija mliječne kiseline (Matijević, 2015). Tradicionalan način proizvodnje sira koristio je „prirodnu“ mikrobnu kulturu na sljedeća dva načina: 1) mlijeko je inkubirano na temperaturi koja je omogućavala rast mikrobne populacije prirodno prisutnih bakterija mliječne kiseline, sve dok nije porasla kiselost, a zatim se koristilo kao mikrobna kultura; 2) korišteno je fermentirano mlijeko ili sirutka iz prethodno dobivenog sira, najčešće uz dodatnu inkubaciju. Sastav tako dobivene mikrobne kulture bio je promjenjiv i neodređen, u ovisnosti od temperature inkubacije, koja je prilagođena vrsti sira, što je ovisilo i o bakterijama mliječne kiseline (Rogelj, 2015). Uloga kulture bakterija mliječne kiseline u proizvodnji svih sireva je primarna, a djelovanje ostalih kultura dolazi do izražaja tek u fazi zrenja sira u zrionici, pri uvjetima optimalnim za određenu vrstu, uz stalnu kontrolu i pravilno njegovanje sira (Tratnik, 1998).

Inovativnost u proizvodnji „prirodnih mikrobnih kultura“ jest prilagoditi/optimizirati njihovu primjenu u manjim industrijskim pogonima. Varijabilnost (u sastavu i veličini pojedinih mikrobnih zajednica bakterija mliječne kiseline) tako dobivenih mikrobnih kultura u industrijskim uvjetima rizična je za ispunjavanje zahtjeva standardne mikrobiološke i senzorske kakvoće proizvoda. Dakle, napredak u znanosti i tehnologiji, do tada potpuno nepoznat sastav mikrobne kulture (sirutka prethodnog dana, nakon inkubacije na temperaturi koja se koristi za cijepljenje svježeg mlijeka), zamijenio je definiranim mikrobnim kulturama, poznatog sastava i djelovanja (Rogelj, 2015).

Definirane mikrobne kulture dobivamo tako da u laboratoriju iz sirove ili prirodne mikrobne kulture (često tradicionalne, od mlijeka) izoliramo, pročistimo i dobro istražimo svojstva pojedinih bakterijskih vrsta/sojeva, a zatim umnožavamo kao čistu kulturu sa željenim svojstvima i čuvamo u optimalnim uvjetima kako bi očuvali vijabilnost i aktivnost kulture.

Nakon toga kulture se mogu koristiti samostalno ili u kombinaciji jedna s drugom. Ovisno o sastavu mikrobne kulture mogu biti pojedinačne (jedan soj određene vrste mikroorganizma), složene (različiti sojevi jedne vrste mikroorganizma) i kombinirane (različiti sojevi različitih vrsta mikroorganizama) (Rogelj, 2015). Moderna mljekarska tehnologija, naročito u sirarstvu, ide za sve većim korištenjem miješanih kultura koje su sastavljene od većeg broja vrsta mikroorganizama. Takozvane monokulture moderna praksa napušta. Vrlo je problematično doziranje koncentrirane kulture jer broj mikroorganizama u takvoj kulturi varira u veoma širokim granicama

Mikrobne kulture mogu se podijeliti prema načinu pripreme (osnova mlijeko, sirutka), obliku pripreme kulture (tekuće, osušene, smrznute), aromi ili drugim produktima fermentacije (homofermentativne, heterofermentativne), temperaturi tehnološkog procesa pri kojoj se koriste (mezofilne, termofilne), vrsti prisutnih mikroorganizama i/ili broju vrsta i sojeva.

Ovisno o vrsti sira, mikrobne se kulture mogu svrstati u nekoliko grupa (Matijević, 2015):

- bakterije mliječne kiseline (BMK), odgovorne za proizvodnju mliječne kiseline, tvari arome, a neke vrste proizvode i CO<sub>2</sub> (zaslužan za sirne oči);
- bakterije propionske kiseline, koje su odgovorne za tvorbu specifične arome i većih količina CO<sub>2</sub> (oblikovanje većih sirnih očiju kod Emmentalera);
- sojevi bakterije *Brevibacterium linens* odgovorni su za tvorbu sluzavosti na površini sira (“maza”), te utječu na tvorbu tipične arome sira i boju;
- plemenite plijesni koje mogu biti na površini sira (bijeke plijesni) ili unutar sira (plavozelene plijesni) koje tvore intenzivan miris i okus sira.

S obzirom na svoju ulogu tijekom tehnološkog procesa proizvodnje sireva, mikrobna kultura može biti osnovna ili dopunska.

### 2.2.1. Osnovne (primarne) kulture

U osnovne ili primarne mljekarske kulture ubrajaju se kulture koje se dodaju mlijeku za sirenje. Uloga osnovnih kultura u proizvodnji sira svodi se na nekoliko značajnih funkcija (Kirin, 2016):

- tvorba mliječne kiseline, odnosno snižavanje pH vrijednosti i optimiranje djelovanja sirila;
- razgradnja bjelančevina do produkata odgovornih za specifični okus i miris sira;
- održavanje omjera laktata, mliječne kiseline i bjelančevina koji su odgovorni za konzistenciju sira i stvaranje sirnih rupica;
- inhibicija rasta štetnih *Clostridium* i koliformnih vrsta bakterija.

Njihova glavna uloga je stvaranje mliječne kiseline, odnosno zakiseljavanje tijekom proizvodnje sira. Primarne kulture uglavnom su monokulture ili mješovite kulture bakterija mliječne kiseline (BMK).

Bakterije mliječne kiseline se koriste u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda kao starter kulture, produžuju trajnost proizvoda te su prihvaćene kao bezopasne za ljudsko zdravlje, odnosno dodijeljen im je GRAS (eng. Generally Recognized As Safe) status prema Američkoj agenciji za hranu i lijekove (FDA, 2005), odnosno QPS (Qualified Presumption of Safety) status prema regulativi Europske Unije (Markov i sur., 2010; Frece i Markov, 2016).

Gotovo uvijek su prisutne u mlijeku i mliječnim proizvodima te čine normalnu mikrofloru mlijeka, obuhvaćajući veliki broj bakterijskih vrsta koje proizvode mliječnu kiselinu previranjem različitih ugljikohidrata, a glavni produkt razgradnje je mliječna kiselina. Otkrio ih je L. Pauster 1857.godine.

One su gram-pozitivni, nesporogeni mikroorganizmi koji rastu samo na kompleksnim podlogama. Isto tako, dio su populacije mikroorganizama probavnog trakta zdravih ljudi i životinja i uključene su u njihov metabolizam. Obuhvaćaju velik broj vrsta koje pripadaju rodovima: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium*, *Weissella* i *Oenococcus* (Ewuoso i sur., 2020).

U mljekarstvu se kao starter kulture koriste samo *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* i *Lactobacillus*. Uglavnom ih nalazimo u medijima kod kojih postoji mogućnost spontanog vrenja ugljikohidrata, a fermentiranoj hrani daju svojstven miris i teksturu, sprječavajući kvarenje i rast patogenih mikroorganizama (Rogelj, 2015). Osim bržeg stvaranja mliječne kiseline i poticanja sirenja, BMK doprinose i aromi, teksturi te nutritivnoj vrijednosti sira.

Obzirom na optimalne temperature rasta BMK dijele se na mezofile (optimalna temperatura 25-30°C) i termofile (optimalna temperatura 40-45°C), dok na osnovu produkata razgradnje metabolizma razlikujemo homofermentativne i heterofermentativne vrste (Tablica 7).

**Tablica 7.** Glavni predstavnici primarnih i sekundarnih kultura, neke njihove značajke i tipovi sireva za čiju se proizvodnju koriste (Rogelj, 2015).

Skupine/vrste/podvrste	Značajke	Vrste sira
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	Mezofilna, primarna, homofermentativna kultura, glavni produkt mliječna kiselina	Polutvrđi, meki sirevi; Gauda, Edam, Brie, Camembert...
<i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i>	Mezofilna, primarna, homofermentativna kultura, glavni produkt mliječna kiselina	Polutvrđi, meki sirevi; Gauda, Edam, Brie, Camembert...
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Termofilna, primarna, homofermentativna kultura	Prvenstveno tvrdi i polutvrđi sirevi s visokom temperaturom dogrijavanja; Emmentaler, Parmezan...
<i>Lactobacillus (Lb.)</i>	Termofilna, primarna,	Prvenstveno tvrdi i polutvrđi

<i>delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	homofermentativna kultura	sirevi s visokom temperaturom dogrijavanja
<i>Lb. delbrueckii ssp. lactis</i>	Termofilna, primarna, homofermentativna kultura	Prvenstveno tvrdi i polutvrđi sirevi s visokom temperaturom dogrijavanja
<i>Lb. helveticus</i>	Termofilna, primarna, homofermentativna kultura	Prvenstveno tvrdi i polutvrđi sirevi s visokom temperaturom dogrijavanja
<i>Leuconostoc (Leuc.) mesenteroides ssp. cremoris</i>	Mezofilna, primarna, heterofermentativna kultura	Polutvrđi i svježi sirevi; Gauda, Edam, svježi sir
<i>Penicillium camemberti</i>	Sekundarna kultura, Plijesan, Sir s plijesni na površini	Camembert, Brie
<i>Penicillium roqueforti</i>	Sekundarna kultura, Plijesan, Sir s plavom plijesni u sirnom tijestu	Roquefort, Gorgonzola
<i>Brevibacterium linens</i>	Sekundarna kultura, Bakterija, Sir s razvojem bakterija na površini	Münster
<i>Propionibacterium freudenreichii spp.</i>	Sekundarna kultura, Bakterija, Švicarske vrste sireva	Emmental, Gruyère, Appenzeller
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Sekundarna kultura, Kvasci, Zrenje na površini sira s plijesni ili bakterijama	Tilsit

Homofermentativne termofilne bakterije tvore najveće količine mliječne kiseline. Stvorena mliječna kiselina utječe na učinak sirila tijekom enzimskoga grušanja mlijeka, kao i na otapanje koloidnog Ca-fosfata iz kazeina (Kirin, 2016) čime utječe na konzistenciju sira. Tijesto sira s većim sadržajem vezanog kalcija je dugo, povezano i gipko s boljim svojstvima oblikovanja sirnih okašaca, dok je tijesto sira s premalo kalcija kratko, drobljivo i blijedo. Komponente arome produkti su djelovanja heterofermentativnih BMK koje metaboliziraju citrat.

Osim toga, one tvore veće ili manje količine plina ugljičnog dioksida koji sudjeluje u oblikovanju karakterističnih sirnih okašaca (Fröhlich-Wyder i sur., 2017).

Proizvodnja metabolita ovisi o prisutnim vrstama Cit+ bakterija u sastavu mezofilne kulture, ali i o količini kisika i citrata. Zbog toga se u sastavu mezofilne kulture nalazi oko 90% bakterija odgovornih za tvorbu kiseline i oko 10% za tvorbu arome i plina (Kirin, 2016). S obzirom na tvorbu mliječne kiseline, arome i plina mezofilne kulture dijele se na: DL-kulture (jaka i relativno brza tvorba arome i plina), L-kulture (sporija tvorba arome i plina), D-kulture (intenzivna i jaka tvorba arome i plina) i O-kulture (ne proizvode aromate i plin, te ne metaboliziraju citrate) (Tablica 8) (Kirin, 2016).

**Tablica 8.** Podjela mezofilnih kultura s obzirom na tvorbu mliječne kiseline, arome i plina (Kirin, 2016)

Mezofilne kulture	Bakterije
DL-kulture	<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> , <i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris</i>
L-kulture	<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> , <i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris</i>
D-kulture	<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> , <i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis ssp. lactis biovar ssp. diacetylactis</i>
O-kulture	<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> , <i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i>

### 2.2.2. Dopunske (sekundarne) kulture

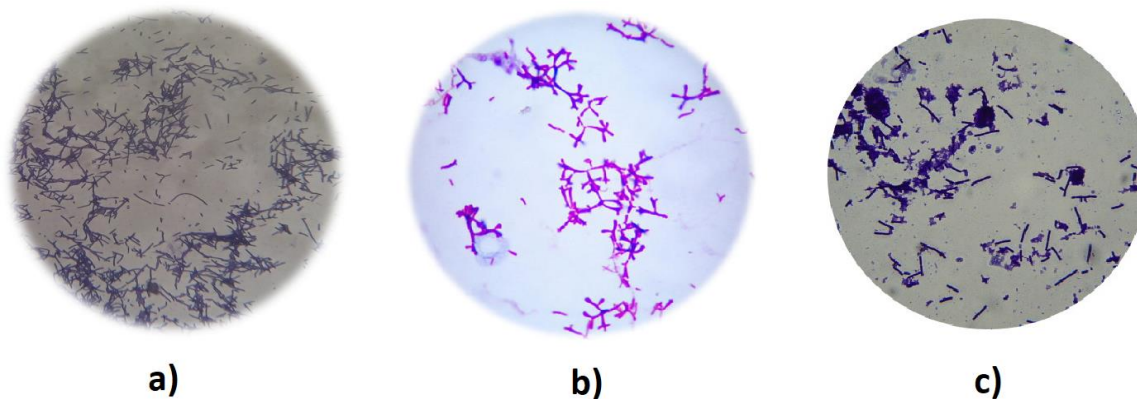
Dopunske (sekundarne) kulture u sirarstvu koriste se s ciljem formiranja specifičnih, jače izraženih senzorskih, organoleptičkih i funkcionalnih svojstava sireva. Takve kulture se ne dodaju mlijeku sa sirenje samostalno, već u kombinaciji sa osnovnom (primarnom) kulturom.

Nazivaju se još i kulturama zrenja sira. Zrenje sireva uključuje dopunske enzimske pretvorbe, nakon što je stvoren sirni ugrušak primjenom enzima proizvedenih s pomoću bakterija mliječne kiseline ili enzima nekog drugog podrijetla. Dopunske kulture su uglavnom različiti aerobni mikroorganizmi (bakterije, plijesni i kvasci) koji nemaju mogućnost razgradnje laktoze do jednostavnih šećera (nemaju enzim  $\beta$ -galaktozidazu).

### 2.2.2.1. Kulture probiotičkih bakterija

Riječ probiotik potječe od grčke riječi pro bios (za život), a definira se kao pojedinačna ili mješovita kultura živih mikroorganizama koji, primijenjene u životinja ili ljudi djeluju korisno na domaćina poboljšavajući mu svojstva autohtone mikroflore (Šušković i sur., 1997). Ravnoteža mikrobnog sustava u ljudskom organizmu može se poremetiti pod utjecajem starenja, liječenja, stresa, prehrane i drugih čimbenika iz okoliša. Stoga, probiotički odnosno sinbiotički koncept podrazumijeva ponovno uspostavljanje ravnoteže crijevne mikroflore i usmjeravanje njenog metabolizma u proizvodnju metabolita korisnih za zdravlje (Šušković i sur., 2009).

Korištenjem ovih kultura postignuta su pozitivna iskustva u proizvodnji svježih i polutvrdih sireva. Inače, pojam probiotici označava proizvod koji sadrži selekcionirane najčešće bakterijske sojeve koji na humani organizam imaju povoljno probiotičko djelovanje. Uzgojeni u mlijeku ti se sojevi koriste za sastav kultura zbog njihovog blagotvornog djelovanja na organizam, a prvenstveno na uravnoteženje intestinalne mikrobne populacije. Probiotičke kulture sadržavaju najčešće probiotičke sojeve bakterija *Lactobacillus acidophilus* (Slika 3a) i *Bifidobacterium bifidum* (Slika 3b). Mogu se kombinirati i s bakterijom mliječne kiseline *Streptococcus thermophilus* (Slika 3c), što dovodi do bržega grušanja i boljeg mirisa svježeg sira. Dodaju se mlijeku za sirenje zajedno s osnovnom kulturom.



**Slika 3.** Mikroskopski prikaz probiotičkih sojeva bakterija: a) *Lactobacillus spp.*, b) *Bifidobacterium bifidum*, c) *Streptococcus thermophilus* i *L. bulgaricus* (Mullan, 2014; Prabhurajeshwar i Chandrakanth, 2019)

### 2.2.2.2. Propionske mikrobne kulture

Propionske bakterije uglavnom su anaerobni gram-pozitivni kratki štapići, čije su optimalne vrijednosti temperature rasta 25-32°C, odnosno pH vrijednosti 6,8-7,2. Propionske bakterije koriste se uglavnom u proizvodnji švicarskog tipa sira poput Ementalera i njemu sličnih sireva,

karakterističnih po veličini sirnih „oka“ („krupnooki sirevi“) i svojstvenom slatkastom okusu. Za rast propionskih bakterija u mlijeku važna također je proteolitička aktivnost bakterija mliječne kiseline.

Stoga se uglavnom upotrebljavaju kao dopunska kultura uz kulture termofilnih bakterija mliječne kiseline pri čemu bakterije mliječne kiseline hidrolizom laktoze oslobađaju glukozu iz koje propionske bakterije zatim tvore propionsku, mliječnu i octenu kiselinu (Kirin, 2016).

Za sirarstvo su važne četiri vrste propionskih bakterija: *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *Freudenreichii*, *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *Shermanii* i *Propionibacterium acidipropionici*. Njihov rast inhibiraju povišene koncentracije soli i kiseline u tijestu sira, što utječe na gubitak elastičnosti tijesta, a posredno i na tvorbu sirnih očiju (Kirin, 2016). Fermentiraju već stvorene laktate, mliječnu kiselinu i glukozu u propionsku kiselinu, octenu kiselinu i ugljični dioksid. Stvoreni plin (CO<sub>2</sub>) otapa se u vodenoj fazi sira do njezina potpunog zasićenja pri čemu se na pojedinim mjestima u tijestu sira nakupljaju mjehurići plina, odnosno stvaraju se buduće sirne oči koje se stalno povećavaju. Broj i veličina očiju ovisi o intenzitetu tvorbe plina CO<sub>2</sub> (Fröhlich-Wyder i sur., 2017). Osim za razvoj sirnih rupica, propionske bakterije odgovorne su i za karakterističan okus takvih vrsta sireva koji proizlazi iz sadržaja hlapljivih masnih kiselina, Ca-propionata, propionske kiseline, sukcinata i aminokiseline prolina (Kirin, 2016). Prolin nastaje iz peptida sira djelovanjem proteolitičkih enzima propionskih bakterija koji se oslobađaju autolizom bakterijskih stanica, a odgovoran je za slatkast okus sira. Osim propionske kiseline, ove bakterije proizvode i veću količinu vitamina B<sub>12</sub> i folata (Hugenschmidt i sur., 2010). Povrh toga, proizvode i bakteriocine koji inhibiraju rast gram negativnih bakterija, kvasaca i plijesni (Kirin, 2016).

*P. freudenreichii* se koristi kao kultura za dozrijevanje švicarskog tipa sira. Također je značajna zbog proizvodnje vitamina B<sub>12</sub> i propionske kiseline te se smatra da ima zaštitne učinke u hrani za ljude i stoku (Thierry i sur., 2011).

#### 2.2.2.3. Kulture kvasaca

Na površini sireva s površinskim mazom i sireva s površinskom plemenitom plijesni na početku zrenja spontano se razvijaju kvasci i bijela plijesan *Geotrichum candidum*. Kvasci pripadaju uglavnom rodovima *Kluyveromyces*, *Debarymyces*, *Pichia*, *Rhodotorula* i *Hansenula*. Njihova je zadaća razgradnja mliječne kiseline u rubnom sloju sira. Na taj način stvaraju optimalnu pH-vrijednost i uvjete rasta površinske mikrobne populacije, uzrokujući zrenje sira od površine prema unutrašnjosti. Proteolitičkom i lipolitičkom aktivnošću, odnosno produktima svog metabolizma utječu na tvorbu arome sira. Sojevi *Geotrichum candidum* imaju ograničenu lipolitičku sposobnost, što se povoljno odražava na čistoću i specifičnost mirisa i okusa sireva poput Camemberta,



proizvedenog u kombinaciji s kulturom bijele plemenite plijesni (Kirin, 2016). Istodobno, ova kombinacija kultura otiseljavanjem tijesta ubrzava zrenje sira, intenzivira proteolitičke procese i pridonosi specifičnijem okusu u odnosu na sir proizveden samo kulturom *Penicillium camemberti*.

#### 2.2.2.4. Kulture plemenitih plijesni

Plemenite plijesni su aerobni mikroorganizmi koji optimalno rastu pri većoj relativnoj vlažnosti, kiselosti (pH oko 4-5) i pri temperaturi oko 20 °C, ali dobro rastu i pri nižoj temperaturi tijekom zrenja sireva. Za pravilan rast plijesni bitno je osigurati jednoličan pristup zraka na površini sira (bijele plijesni) ili unutar sira (plave plijesni) (Tratnik, 1998). Kulture plemenitih plijesni koriste se u proizvodnji plemenitih sireva zajedno s mezofilnom kulturom BMK, a ponekad i s termofilnom kulturom kao u proizvodnji gorgonzole (*S. thermophilus* i *L. bulgaricus*, Slika 3c) ili u proizvodnji sireva Camembert i Brie (Tratnik, 1998).

Sirevi s plemenitom plijesni su bogati kalcijem i fosforom, vitaminima i proteinima koji sadrže aminokiseline koje su neophodne našem organizmu. Proizvode se od najmasnijeg kravljeg ili ovčjeg mlijeka, a mogu se podijeliti u dvije grupe. Prvu grupu čine bijeli sirevi koji na površini imaju sasušenu kožicu s bijelom plijesni. Tijesto im je glatko, plastično i elastično, a dugim zrenjem postaje mekano do vrlo mazivo, slično strukturi toplog maslaca. Na početku zrenja takav sir ima blagi okus, a duljim zrenjem okus postaje sve oštriji uz miris na amonijak (Božanić, 2015). Vrlo zreli sirevi ovog tipa mogu imati intenzivan miris i okus. Pakiraju se u aluminijske folije i budući da pripadaju grupi polumekih sireva, stavljaju se u kartonske ili drvene kutije kako se ne bi deformirali tijekom transporta. Najpoznatiji predstavnici ove grupe sireva su Camembert i Brie (Slika 4) (Božanić, 2015).



**Slika 4.** Sirevi Camembert (lijevo) i Brie (desno) (Anonymus, 2019)

Drugu grupu sireva s plemenitim plijesnima čine plavi sirevi. Za razliku od bijelih plijesni koje se nalaze isključivo na površini sira, plavo-zelene plijesni nalaze se unutar sira. Plavi sirevi imaju sasušenu kožicu na površini, tijesto im je bijelo do blago rumeno prošarano plavo-zelenim plijesnima. Okus plavog sira je blago kiselkast do vrlo pikantan ako se provodi dulje zrenje. Obično su znatno slaniji u odnosu na bijele sireve, a ukoliko se rade iz ovčjeg mlijeka, tada imaju znatno intenzivniji miris i okus (Božanić, 2015). Najpoznatiji predstavnici ove grupa sireva su Roquefort (Slika 5) koji se radi isključivo iz ovčjeg mlijeka, te sirevi iz kravljeg mlijeka: Gorgonzola i Stilton. Danas se na tržištu javljaju i sirevi proizvedeni kombinacijom bijelih i plavozelenih plijesni. Takvi sirevi imaju bijele plijesni na površini sira te plave plijesni koje prožimaju unutrašnjost sira (Božanić, 2015).



**Slika 5.** Sir Roquefort (Anonymus, 2021)

#### 2.2.2.5. *Kulture površinskog maza sira*

Osim kolonija kvasaca i plijesni *Geotrichum candidum*, na površini sireva sa žutim ili crvenim mazom (Romadur, Limburger i sl.) obavezno se nalaze i kromogene bakterije, od kojih je najpoznatija *Brevibacterium linens*. Optimalni su uvjeti rasta *Brevibacterium linens*: su visoka relativna vlažnost u zrioni (85%), temperature oko 22°C te pH-vrijednost sira viša od 6,0. *B. linens* podnosi visoku koncentraciju kuhinjske soli u siru. Osim nje u površinskoj mikrobnj populaciji zastupljene su i kromogene bakterije skupina *Corynebacterium* i *Rhodococcus*.

Osim tvorbe boje, koja nijansira od žute preko narančaste do crvene, sve ove bakterije odlučujuće utječu i na tvorbu okusa i mirisa sireva. *Brevibacterium linens* tvori hlapljive spojeve okusa ne samo iz bjelančevine nego i iz citrata, laktoze i mliječne masti (Kirin, 2016), a stvoreni metilsulfid ima glavnu ulogu u formiranju arome.

Stvoreni površinski maz treba biti žućkastosmeđe boje i ugodnog mirisa, karakterističnog za vrstu sira. Kako malo bakterija dospijeva na površinu sira i aktivira se tek nakon njezine deacidifikacije, nesvrhovito je dodavati kulturu *Brevibacterium linens* mlijeku za sirenje, stoga se

ona nanosi na površinu sira višekratnim četkanjem sira u otopini kulture i kuhinjske soli, ili prskanjem sireva i zrione ovom otopinom (Kirin, 2016).

#### 2.2.2.6. *Zaštitne mikrobne kulture*

Zaštitne (protektivne) mikrobne kulture proizvode tvari koje inhibiraju rast tehnološki štetnih i zdravstveno opasnih mikroorganizama u siru. Glavni predstavnici su bakterije mliječne kiseline čije je antagonističko djelovanje prema bakterijama uzročnicima kvarenja i patogenim bakterijama odavno poznato (Çadirci i Çitak, 2005).

Osnovu njihova bakteriostatskog i baktericidnog učinka čini mliječna kiselina i niska pH vrijednost. Isto tako, neke vrste ovih bakterija tvore vodikov peroksid koji ima snažna dezinfekcijska svojstva (Enitan i sur., 2011).

Osim njihova nespecifičnoga inhibitornog djelovanja, ove bakterije imaju sposobnost tvorbe i specifičnih inhibitornih tvari kao što su bakteriocini. Po definiciji, bakteriocini su ekstracelularne supstance proteinske prirode, djelotvorne prema sojevima iste ili srodne vrste (Šušković i sur., 1997). Bakteriocini su sigurni biokonzervansi koji su zbog svoje aktivnosti protiv niza patogenih bakterija i bakterija kvarenja, izuzetno važni za mljekarsku i prehrambenu industriju (Chen i Hoover, 2003; Nandane i sur., 2007). Najpoznatiji bakteriocin je nizin (Šušković i sur., 1997). Danas postoje zaštitne mikrobne kulture koje u svježim i mekim mliječnim proizvodima proizvode različite antimikrobne tvari i time produžuju trajnost proizvoda.

#### 2.2.3. **Čuvanje i održavanje mikrobnih kultura**

Sastav mikroflore varijabilan je i pod velikim utjecajem uvjeta okoline (uvjeti proizvodnje, čuvanja), uslijed čega proizvodnja fermentiranih proizvoda može rezultirati neujednačenom kakvoćom proizvoda. Sirovine u proizvodnji autohtonih fermentiranih proizvoda vrlo često su izvor rasta različitih mikroorganizama koji mogu kontaminirati konačni proizvod. Čuvanje i održavanje mikrobnih kultura zahtijeva posebnu pažnju i odgovarajuću kontrolu kvalitete kako bi se osiguralo da obnovljene kulture djeluju na isti način kao i izvorne kulture. To zahtijeva visoki stupanj stručnosti u održavanju i upravljanju mikrobnim kulturama na ultra niskim temperaturama ili kao smrznuti materijal, kako bi se osigurao njihov dugoročni integritet i važnost za buduća istraživanja, razvoj i očuvanje (Kumar i sur., 2013).

Primjena komercijalnih starter kultura doprinosi postizanju standardnih senzorskih svojstava proizvoda (aroma, boja, tekstura), no istodobno se gube specifična svojstva tradicionalnog proizvoda koja su rezultat aktivnosti autohtone mikroflore. U svrhu očuvanja svojstava tradicionalnih proizvoda, u posljednje vrijeme sve je veći trend pronalaženja i selektiranja autohtonih starter

kultura iz tradicionalnih proizvoda (Frece i sur., 2020). Stoga održavanje i održivost starter kulture u fermentiranoj hrani još uvijek predstavlja izazov za industrijski proces.

Kako bi se osigurala vijabilnost i stabilnost mikrobne kulture tijekom tehnološkog procesa, razvijeno je nekoliko tehnika pripreme specijalnih oblika mikrobnih kultura za pojedine proizvode. Ovisno o vrsti sira, tehničkim uvjetima sirane i kapacitetima proizvodnje, stručnoj osposobljenosti osoblja i kalkulacijama troškova, mikrobne (starter) kulture proizvode se i isporučuju kao tekući, matični, liofilizirani (suho smrznuti) ili koncentrirani smrznuti pripravci kulture (Kirin, 2016).

### **2.3. Neki postupci zaštite i održavanja stabilnosti mikrobnih kultura**

Proizvodnja mikrobnih kultura u pravilu započinje izolacijom čiste kulture te njenim daljnjim umnožavanjem, koncentriranjem i prevođenjem u željeni oblik za daljnju upotrebu u proizvodnji određenog proizvoda.

Koncentriranje kulture većinom je usmjereno na separiranje stanica iz medija za uzgoja pomoću centrifuge. Daljnja obrada i stabilizacija mikrobne kulture ovisi o tipu željenog konačnog pripravka. Pri tome je glavni cilj koncentrirati miješane kulture bez promjene međusobnog odnosa između pojedinih vrsta, očuvati vijabilnost kulture te osigurati zaštitu tijekom daljnje primjene u proizvodnji. Važno je osigurati optimalne uvjete tijekom pripreve i čuvanja mikrobnih kultura (sastav hranjive podloge, temperatura rasta, trajanje fermentacije, miješanje, homogenizacija itd.) radi mikrobiološke stabilnosti proizvoda. Dodatkom različitih zaštitnih tvari, uklapanjem u mikrokapsule tijekom zamrzavanja, sušenja ili čuvanja, može se bitno povećati broj živih stanica po gramu pripravka (Anal i Singh, 2007; Champagne i Fustier, 2007).

#### **2.3.1. Sušenje raspršivanjem (eng. *Spray Drying*)**

Sušenje raspršivanjem (engl. *Spray Drying*) je raširena tehnika koja se koristi za čestice veličine manje od 40  $\mu\text{m}$ . Najviše korišteni materijali za inkapsulaciju su polisaharidi (maltodekstrin, škrob, arapska guma i kukuruzni sirup), lipidi (monogliceridi, digliceridi i stearinska kiselina) i proteini (kazein, želatina, soja, pšenica i mliječni serum). Proces sušenja raspršivanjem se sastoji od atomiziranja homogeniziranog nosećeg materijala (1:4) u plin za sušenje, što rezultira s kapsulama u obliku suhog praha, kontroliranim kroz protok plina, proizvodnu sirovinu i temperaturu (Slika 6c). Iznimno je pogodno za industrijsku uporabu zbog rapidnosti, niske cijene i visoke reproduktivnosti. Uporaba visoke temperature je glavni nedostatak u sušenju raspršivanjem zato što nije kompatibilno za bakterijsku održivost (Ray i sur., 2016).

Za prehrambenu uporabu, probiotičke kulture su često korištene kao sprej ili smrznuti prah. Učinkovitost sušenja raspršivanjem je opisana u slučajevima s bakterijama *L. paracasei*,

*Bifidobacterium ruminantium* i *L. rhamnosus*. Međutim, ekstremne temperature i osmotski uvjeti tijekom procesa oštećuju staničnu membranu i navedeni proteini znatno smanjuju probiotičku aktivnost unutar nekoliko tjedana hladnog skladištenja. Behboudi-Jobbehdar i sur. (2013) su usporedili održivost bakterije *L. acidophilus* sušene raspršivanjem koristeći natrijev alginat, kitozan i hidroksipropil metil celulozu (HPMC) i otkrili su da natrijev alginat i HPMC nisu utjecali na održivost stanica. Kitozan je poboljšao stabilnost *L. acidophilusa* tijekom skladištenja i bolja održivost je zabilježena nakon 35 dana skladištenja. Sušenje raspršivanjem bakterije *Bifidobacterium lactis* Bb-12 s proteinom sirutke je poboljšalo održivost stanica pod žučnim uvjetima i stabilnost tijekom 12 tjedana skladištenja (de Castro-Cislaghi i sur., 2012). Dodatak termoprotektora poput trehaloze prije sušenja uz škrob i topiva vlakna poboljšava održivost kulture tijekom skladištenja.

### **2.3.2. Liofilizacija (engl. *Freeze Drying*)**

Liofilizacija (engl. *Freeze Drying*) ili sušenje proizvoda u zamrznutom obliku postupak je koji se koristi za dehidraciju i stabiliziranje gotovo svih materijala na toplinu jer se postupak sušenja, odnosno uklanjanje tekućeg dijela materijala odvija sublimacijom. Metoda smrzavanja raspršivanjem je razvijena da se riješe poteškoće koje se događaju tijekom izlaganja mikrobnih stanica visokim temperaturama kod sušenja raspršivanjem. Slična oprema koja se koristi kod sušenja raspršivanjem se koristi i za ovaj proces, samo što se umjesto vruće komore koristi hladna komora ili komora koja ispuhuje hladni zrak (Champagne i Fustier, 2007).

Proces se sastoji od dvije faze: zamrzavanja materijala u tankom sloju pri temperaturi od -15°C do -70°C i sušenja zamrznutog materijala u vakuumu pri niskim temperaturama (sublimacija) (Šušković, 2009). Primarnim se sušenjem iz pripravka izdvaja tzv. slobodna voda i smatra se da je završeno kad u pripravku više nema leda (sublimacija okončana), odnosno preostane 6-8 % vode. Sekundarno sušenje je sušenje iz "tekućeg" stanja i njime se nastoji ukloniti tzv. vezana voda, jer je ona čimbenik koji može spriječiti uspješno čuvanje osušenog liofilizata, osobito kod sobne temperature (Runjić-Perić, 1996).

Dehidracija se često primjenjuje kao metoda stabilizacije mikrobnih kultura radi njihovog lakšeg skladištenja, transporta i kasnije primjene. Liofilizacijom se izbjegava denaturacija uzrokovana zagrijavanjem proizvoda na način da ga se održava u zamrznutom obliku tijekom postupka sušenja. Uvjeti obrade povezani sa sušenjem zamrzavanjem blaži su od sušenja raspršivanjem te je veća probiotička stopa preživljavanja (Wang i sur., 2004). Kako bi se osigurali optimalni rezultati u sušenju kultura, treba osigurati što je moguće manja oštećenja staničnih komponenti.

Različiti krioprotektori, odnosno lioprotektori, poput obranog mlijeka u prahu, proteina sirutke, trehaloze, glicerola, betaina, adonitola, saharoze, glukoze, laktoze, dekstrana i polietilenglikola (Morgan i sur., 2006) dodaju se u suspenziju stanica prije provedbe samog postupka liofilizacije kako bi se povećalo preživljavanje mikrobnog kulture tijekom dehidracije.

Prednosti postupaka liofilizacije uključuju:

- smanjenje kontaminacije;
- minimalno oštećenje i gubitak aktivnosti termolabilnih materijala;
- brzinu i cjelovitost rehidracije
- mogućnost točnog i sterilnog doziranja konačnih proizvoda u spremnike i dr.

Unatoč dugom vremenu sušenja, velikom utrošku energije i skupoj opremi koja liofilizaciju kao metodu sušenja opravdava samo ako se proizvode pripravci velike vrijednosti i kvalitete, velika osjetljivost BMK prema dehidraciji i njihov doprinos prehrambenoj industriji opravdava primjenu ove metode za proizvodnju starter kultura za sirarstvo.

### **2.3.3. Inkapsulacija**

Inkapsulacija je postupak ugradnje sastojaka hrane, enzima, stanica ili drugih materijala u male kapsule. Drugim riječima, proces inkapsulacije se sastoji od zarobljavanja aktivne tvari u stijenku druge supstance koja proizvodi čestice u različitim veličinama. Inkapsulirani materijal se inače naziva jezgra, punjenje te aktivna, interna ili teretna faza, dok se materijal korišten za inkapsulaciju naziva obložna membrana, čahura, kapsula, noseći materijal ili matrica (Burgain i sur., 2011; Fang i Bhandari, 2010). Prema tome, inkapsulacija uključuje širok niz faktora: inkapsulirani materijal, obložni materijal, proces, funkcionalnost te svojstva inkapsuliranih sustava.

Inkapsulacija starter kulture pruža zaštitu stanicama i time poboljšava održivost koncentracije aktivnih mikrobnih stanica, dijelova njihovih stanica i/ili enzima. Za uspješnu inkapsulaciju živih stanica, izuzetno je važno očuvati bakterijsku održivost tijekom različitih procesa rukovanja zajedno s inkapsulacijskim materijalom koji je kompatibilan s prehranbenim materijalom. Uklapanjem u mikrokapsule dolazi do stabilizacije stanica odnosno poboljšava se njihova aktivnost i stabilnost tijekom proizvodnje, skladištenja i korištenja. Pored toga, postupak uklapanja u mikrokapsule pridonosi i dodatno štiti stanice laktobacila i bifidobakterija tijekom procesa rehidracije i liofilizacije.

Ova tehnika se intenzivno koristi u prehrambenoj industriji kao učinkovita barijera koja štiti tekuće i čvrste sastojke protiv raznih okolišnih parametara (kisik, svjetlo, slobodni radikali itd.) (Desai i Park, 2005).

Uspostavljanje fizičke barijere između živih stanica probiotičkih mikroorganizama i nepovoljnih vanjskih uvjeta novi je koncept od sve veće važnosti.

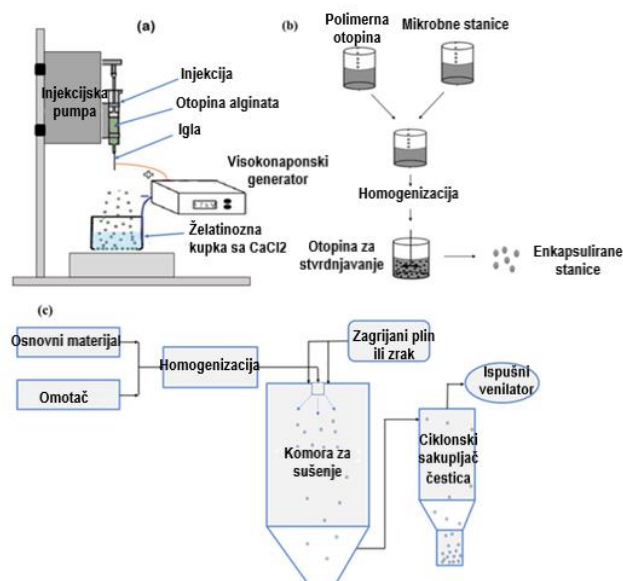
Inkapsulacija aktivnih tvari u noseći materijal se može postići s nekoliko metoda poput: sušenja raspršivanjem, hlađenja raspršivanjem, ekstruzijom, emulgiranjem, oblaganjem fluidiziranim slojem, primjenom liposoma, liofilizacijom, koacervacijom, razdvajanjem centrifugirane suspenzije, kokristalizacijom, kompleksiranjem inkluzije te termalnim geliranjem.

Ekstruzija (engl. „*extrusion*“) je jedna od uobičajenih metoda za proizvodnju hidrokoloidnih kapsula kroz jednostavnu i jeftinu proceduru s minimalnom štetom na probiotičkim stanicama i relativno većom održivošću. U ovom sustavu (Slika 6a), hidrokoloidna otopina je pomiješana s mikroorganizmima i ta mješavina se u obliku kapljice ubrizga sa ekstruderom ili špicom u očvršćujuću otopinu (kalcijev klorid) koja se sastoji od multivalentnih kationa (Krasaekoopt i sur., 2004).

Emulgiranje (engl. „*emulsion-based encapsulation*“) je kemijska metoda koja se intenzivno koristi za inkapsulaciju živih stanica uz pomoć hidrokoloida (alginat, karagenan i pektin) kao materijala u staničnoj stijenci, koji se inače dobivaju kroz tehniku membranske filtracije (Slika 6b). Za razliku od ekstruzije, emulgiranje nudi prednosti poput lakšeg postepenog povećavanja, visoke bakterijske stope preživljavanja i manjeg promjera kapsula (25  $\mu\text{m}$ -2 mm), dok je glavni nedostatak velik oblik i raspon te veći trošak izvedbe zbog uporabe biljnog ulja u stvaranju emulzije (Krasaekoopt i sur., 2004; Kailasapathy, 2006).

Razni faktori poput fizičkih i kemijskih karakteristika jezgre i nosećeg/obložnog materijala te njihova predložena primjena u prehrambenoj matrici mogu utjecati na odabir odgovarajućeg inkapsulacijskog procesa. Od svih navedenih metoda ekstruzija, emulgiranje i sušenje raspršivanjem su najdjelotvornije za inkapsulaciju bakterija mliječne kiseline (Kavitake i sur., 2018).

Prema veličini proizvedenih kuglica, inkapsulacija se može klasificirati u dvije vrste: makroinkapsulacija (milimetri - centimetri) i mikroinkapsulacija (1–1000  $\mu\text{m}$ ) (Heidebach i sur., 2012).



**Slika 6.** Shematski prikaz metoda inkapsulacije (a) Ekstruzija (b) Emulgiranje (c) Sušenje raspršivanjem (Kavitake i sur., 2018).

### 2.3.3.1. Mikroinkapsulacija mikrobnih kultura

Mikroinkapsulacija aktivnih agensa u biopolimerne matrice je proces kojim se aktivni sastojci mogu zaštititi unutar matriksa sfere (King, 1995). Aktivni sastojak može biti u čvrstom, tekućem ili plinovitom stanju. Mikroinkapsulirani materijal se naziva jezgrom, unutarnjom fazom, ispunom aktivnom tvari, dok se materijal koji se koristi za mikroinkapsuliranje naziva membrana za oblaganje, kapsula, ljuska, stijenka materijala, matriks ili vanjska faza (Augustin i sur., 2001; Burgain i sur., 2011; Fang i Bhandari, 2010).

U prehrambenoj industriji, mikroinkapsulacija se najčešće odnosi na implementaciju bioaktivnih molekula (antioksidansa, mineralnih tvari, vitamina, fitosterola, masnih kiselina) i živih stanica (probiotika) u različite prehrambene proizvode (Nedovic i sur., 2011).

Za učinkovito mikroinkapsuliranje živih stanica, potrebno je odabrati odgovarajuća sredstva. Kriterij za odabir materijala stijenke temelji se na fizikalno-kemijskim svojstvima tvari (poroznost, topljivost) i sredstvima (viskoznost, mehanička svojstva), kao i na kompatibilnosti između dviju tvari (stijenka materijala treba bit netopljiva i ne smije reagirati sa sastojkom koji se inkapsulira). Drugi kriterij koji se uzima u obzir je zamišljena veličina mikrosfere. Nosač materijala koji se koristi u prehrambenim proizvodima mora biti prihvatljiv za primjenu u prehrambenoj industriji i imati sposobnost stvaranja zaštitne ovojnice između aktivnog sastojka i njegove okoline.



Korištenje inkapsuliranih stanica u odnosu na formulacije slobodnih stanica ima nekoliko prednosti: zaštita od biotičkih stresova i abiotičkih stresova kao što je inhibicijski učinak toksičnih stresova, povećano preživljavanje probiotika i poboljšana fiziološka aktivnost te povećana gustoća stanica (Haffner i sur., 2016). Albertini i drugi (2010) su napomenuli da je inkapsulacija bakterija *Bifidobacterium lactis* BI07 i *Lactobacillus acidophilus* LA14 kroz ekstruziju uz pomoć alginata, celuloznog acetata, ftalata i ksantan gume pokazala odlične rezultate, s izvrsnom stabilnošću na temperaturi od 5°C do 9°C (nekoliko mjeseci) u hladnom skladištenju i pojačanom otpornošću u uvjetima sa želučanom kiselinom.

Međutim, mliječni proteini i šećerni alkoholi (natrijev kazeinat, obrano mlijeko, koncentrat proteina sirutke, sojin protein u kombinaciji s glicerolom, manitolom ili maltodekstrinom) nude bolju zaštitu od kiselinskog i žučnog okruženja za probiotik *Bifidobacterium longum* nakon sušenja smrzavanjem. Mikročestice *Bifidobacterium* BB-12 proizvedenih emulzifikacijom/internim geliranjem s natrijevim alginatima kao obložnim materijalom su pružale efektivnu zaštitu pod simuliranim gastrointestinalnim uvjetima i tijekom 120 dana u smrznutom stanju (Kavitake i sur., 2018). Proces mikroinkapsulacije je obećavajuća tehnika za zaštitu starter i probiotičkih kultura od nepovoljnih uvjeta kojima mogu biti izloženi.

### 3. ZAKLJUČCI

Na temelju dosad objavljenih publikacija u području proizvodnje i primjene mikrobnih kultura u prehrambenoj industriji može se zaključiti sljedeće:

1. Tradicionalna proizvodnja sira na malim gospodarstvima tijekom vremena je zamijenjena proizvodnjom sira u nacionalnim i multinacionalnim prehrambenim industrijama.
2. Definirane mikrobne kulture za razliku od autohtone mikroflore osiguravaju provedbu kontrolirane fermentacije i pravilne biokemijske procese tijekom zrenja sira.
3. Primjenom definiranih mikrobnih kultura značajno se poboljšavaju fizikalno-kemijska svojstva proizvedenog sira (miris, tekstura, boja), ali stabilnost i sigurnost proizvoda budući da sprječavaju kvarenje i rast patogenih mikroorganizama.
4. Mikrobne kulture koje se primjenjuju u sirarstvu imaju i probiotičko te sinbiotičko djelovanje pa doprinose terapijskim i funkcionalnim svojstvima sira, odnosno u konačnici održavanju mikrobiološke i imunološke ravnoteže u gastrointestinalnom sustavu čovjeka.
5. Sastav i vijabilnost mikrobnih kultura pod velikim su utjecajem uvjeta okoline, stoga se za očuvanje stabilnosti i integriteta mikrobnih kultura u sirarstvu najčešće koriste postupci sušenja raspršivanjem, liofilizacija i inkapsulacije. Inkapsulacija starter kulture pruža zaštitu stanicama i time poboljšava održivost koncentracije aktivnih mikrobnih stanica, dijelova njihovih stanica i/ili enzima.
6. Fermentacija s inkapsuliranim starter kulturama pruža brojne prednosti u usporedbi s tradicionalnim načinima kultivacije jer osigurava veću gustoću stanica, pojačanu toleranciju na uvjete okoline (npr. visoke temperature, toksičnost medija, selektivno uklanjanje toksičnih hidrofobnih supstanci) i omogućava kontrolirano otpuštanje supstanci u željenom trenutku.

## 4. LITERATURA

- Albertini, B., Vitali, B., Passerini, N., Cruciani, F., Di Sabatino, M., Rodriguez, L., Brigidi, P. (2010): Development of microparticulate systems for intestinal delivery of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **40**, 359–366.
- Anal, A. K., Singh, H. (2007): Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, **18**, 240-251.
- Augustin, M. A., Sanguansri, L., Margetts, C., Young, B. (2001): Microencapsulating food ingredients. *Food Australia*, **53** (6): 220-223.
- Anonymus (2019): Which is better – Brie or Camembert?, <https://www.bhg.com.au/what-is-the-difference-between-brie-camembert> (14.07.2021.).
- Anonymus (2021): Corrieri Culinary: Eating for the pure ecstasy of it! <https://corriericulinary.com/cheese/> (14.07.2021.).
- Anonymus (2021): Discover local ingredients, traditional dishes & authentic restaurants <https://www.tasteatlas.com/roquefort> (14.07.2021.).
- Behboudi-Jobbehdar, S., Soukoulis, C., Yonekura, L., Fisk, I. (2013): Optimization of spray-drying process conditions for the production of maximally viable microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748. *Drying Technology*, **31**, 1274–1283.
- Božanić, R. (2015): Vrste sireva i značaj u prehrani ljudi, U: Sirarstvo u teoriji i praksi, str. 47 – 58., Veleučilište u Karlovcu, Karlovac; [http://napredak.vuka.hr/fileadmin/napredakrepozitorij/prirucnik/Sirarstvo\\_u\\_teoriji\\_i\\_praksi\\_n et.pdf](http://napredak.vuka.hr/fileadmin/napredakrepozitorij/prirucnik/Sirarstvo_u_teoriji_i_praksi_n et.pdf) (02.06.2021.).
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., Scher, J. (2011): Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, **104**, 467–483.
- Çadirci, B. H., Çitak, S. (2005): A comparison of two methods used for measuring antagonistic activity of lactic acid bacteria. *Pakistan Journal of Nutrition*, **4** (4), 237-241.
- Champagne, C. P., Fustier, P. (2007): Microencapsulation for them proved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, **18**, 184-190.
- Chen H., Hoover D. G. (2003): Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive*

*Reviews in Food Science and Food Safety*, **2** (3): 82-100.

Choton, S., Gupta, N., Bandral, J., Anjum, N., Choudary, A. (2019): Extrusion technology and its application in food processing.

de Castro-Cislaghi, F. P., Silva, C. D. R. E., Fritzen-Freire, C. B., Lorenz, J. G., Sant'Anna, E. S. (2012): *Bifidobacterium Bb-12* microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. *Journal of Food Engineering*, **113**, 186–193.

Desai, K. G. H., Park, H. J. (2005): Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, **22**, 179–192.

Enitan, A., Adeyemo, J., Ogunbanwo, S. T. (2011): Influence of growth conditions and nutritional requirements on the production of hydrogen peroxide by lactic acid bacteria. *African journal of microbiology research*, **5** (15), 2059-2066.

Ewuoso, M. O., Animashaun, O. H., Adejumo, A. A. (2020): Lactic acid bacteria and yeasts in spontaneously fermented sorghum sourdough. *American Journal of Microbiological Research*, **8** (2), 63-72.

Fang, Z., Bhandari, B. (2010): Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends in Food Science and Technology*, **21**, 510–523.

Frece J., Markov, K. (2016): Autochthonous starter cultures U: Fermented Meat Products: Health Aspects, (Zdolec, N., ured.), In Book series: Food biology, R.C. Ray (Editor), CRC Taylor & Francis.

Frece, J., Markov, K., Čanak, I., Kostelac, D., Jakopović, Ž. (2020): Fermentirana hrana: mikrobiologija i starter kulture, Sveučilište Sjever, Koprivnica.

Fröhlich-Wyder, M. T., Bisig, W., Guggisberg, D., Jakob, E., Turgay, M., Wechsler, D. (2017): Cheeses with propionic acid fermentation. In *Cheese* (pp. 889-910). Academic Press.

Haffner, F.B., Diab, R., Pasc, A. (2016): Encapsulation of probiotics: insights into academic and industrial approaches. *AIMS Materials Science*. **3** (1): 114-136.

Havranek, J., Kalit, S., Antunac, N., Samaržija, D. (2014.): *Sirarstvo*, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

Heidebach, T., Först, P., Kulozik, U. (2012): Microencapsulation of probiotic cells for food applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **52**, 291–311.

Hugenschmidt, S., Schwenninger, S. M., Gnehm, N., Lacroix, C. (2010): Screening of a natural biodiversity of lactic and propionic acid bacteria for folate and vitamin B12 production in supplemented whey permeate. *International dairy journal*, **20** (12), 852-857.

Kailasapathy, K. (2006): Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yogurt. *LWT Food Science and Technology*, **39**, 1221–1227.

Kalit, S. (2015): Opće sirarstvo, U: Sirarstvo u teoriji i praksi, str. 29-45., Veleučilište u Karlovcu, Karlovac; [http://napredak.vuka.hr/fileadmin/napredakrepositorij/prirucnik/Sirarstvo\\_u\\_teoriji\\_i\\_praksi\\_net.pdf](http://napredak.vuka.hr/fileadmin/napredakrepositorij/prirucnik/Sirarstvo_u_teoriji_i_praksi_net.pdf) (05.06.2021.).

Kavitake, D., Kandasamy, S., Devi, P. B., Shetty, P. H. (2018): Recent developments on encapsulation of lactic acid bacteria as potential starter culture in fermented foods—A review. *Food Bioscience*, **21**, 34-44.

King A. H. (1995): Encapsulation of food ingredients: A review of available technology, focusing on hydrocolloids. U: Encapsulation and controlled release of food ingredients (Ur. Risch S. J., Reineccius.

Kirin, S. (2016): Sirarski priručnik, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. (2004): Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yogurt. *International Dairy Journal*, **13**, 3–13.

Kumar, S., Kashyap, P. L., Singh, R., Srivastava, A. K. (2013): Preservation and maintenance of microbial cultures. In *Analyzing Microbes* (pp. 135-152). Springer, Berlin, Heidelberg.

Markov, K., Frece, J., Čvek, D., Lovrić, N., Delaš, F. (2010): Aflatoksin M1 u sirovom mlijeku i vezanje aflatoksina pomoću bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka*, **60**, 244-251.

Matijević, B. (2015): Dodaci u proizvodnji sira i njihov značaj, U: Sirarstvo u teoriji i praksi, str. 103 – 111., Veleučilište u Karlovcu, Karlovac; [http://napredak.vuka.hr/fileadmin/napredakrepositorij/prirucnik/Sirarstvo\\_u\\_teoriji\\_i\\_praksi\\_net.pdf](http://napredak.vuka.hr/fileadmin/napredakrepositorij/prirucnik/Sirarstvo_u_teoriji_i_praksi_net.pdf) (14.06.2021.).

Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A., Vesey, G. (2006): Preservation of microorganisms by drying: A review. *Journal of Microbiological Methods*, **66**, 183-193.

Mullan, W. M. A. (2014): Starter Cultures: Importance of Selected Genera. *Encyclopedia of*

*Food Microbiology*, 515–521.

Nandane A. S., Tapre A.R., Ranveer R. C. (2007): Applications of bacteriocins as bio-preservative in foods: a review. *ADIT J of Engg*, **4** (1): 50-55.

Narodne novine (2009): Pravilniku o sirevima i proizvodima od sireva, Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja. [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2009\\_02\\_20\\_446.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2009_02_20_446.html) (08.06.2021.).

Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S. and Bugarski, B. (2011): An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, **1**: 1806-1815.

Prabhurajeshwar, C., Chandrakanth, K. (2019): Evaluation of antimicrobial properties and their substances against pathogenic bacteria in-vitro by probiotic *Lactobacilli* strains isolated from commercial yoghurt. *Clinical Nutrition Experimental*, **23**, 97-115.

Ray, M., Ghosh, K., Singh, S., Mondal, K. C. (2016): Folk to functional: An explorative overview of rice-based fermented foods and beverages in India. *Journal of Ethnic Foods*, **3**, 5–18.

Rogelj, I. (2015): Mikrobne kulture u proizvodnji sira, U: *Sirarstvo u teoriji i praksi*, str. 113-123., Veleučilište u Karlovcu, Karlovac; [http://napredak.vuka.hr/fileadmin/napredakrepozitorij/prirucnik/Sirarstvo u teoriji i praksi n et.pdf](http://napredak.vuka.hr/fileadmin/napredakrepozitorij/prirucnik/Sirarstvo_u_teoriji_i_praksi_n et.pdf) (11.06.2021.).

Runjić-Perić, V. (1996): Kultiviranje združenih bakterija mliječne kiseline za silažne starterkulture. Doktorski rad. Zagreb. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Šušković, J. (2009): Probiotici kao živi lijekovi, predavanje iz kolegija "Probiotici i starter kulture", Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Šušković, J., Brkić, B., Matošić, S. (1997): Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka*, **47** (1), 57-73.

Šušković, J., Kos, B., Frece, J., Beganović, J., Pavunc, A. L. (2009): Probiotički koncept–probiotici kao dodaci hrani i probiotici kao bioterapeutici. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, **4** (3-4), 77-84.

Thierry, A., Deutsch, S. M., Falentin, H., Dalmaso, M., Cousin, F. J., Jan, G. (2011): New insights into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii*. *Int. J. Food*

*Microbiol*, **149**, 19-27.

Tratnik, L.J. (1998): Mlijeko –tehnologija, biokemija i mikrobiologija, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, 13-217.

Walther, B., Schmid, A., Sieber, R., Wehrmüller, K. (2008): Cheese in nutrition and health. *Dairy Science and Technology*, **88** (4-5), 389-405.

Wang, Y. C., Yu, R. C., Chou, C. C. (2004): Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soy milk after drying, subsequent rehydration and storage. *International Journal of Food Microbiology*, **93**, 209-217.

Xu, Y., Ye, J., Zhou, D., Su, L. (2020): Research progress on applications of calcium derived from marine organisms. *Scientific Reports*, **10** (1), 1-8.